

REVISÃO E SÍNTESE

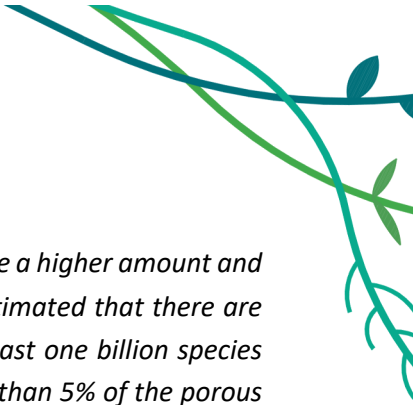
Microbiota do solo: a diversidade invisível e a sua importância

Daniela R. Q. Bald¹, Caroline P. Rangel¹, Alvina Fernanda Vargas¹, Karen T. Girão¹, Luciane Maria P. Passaglia¹

Resumo: Micro-organismos estão presentes em todos os lugares da Terra que suportam vida. Os solos apresentam maior quantidade e diversidade bacteriana do que a água ou o ar, devido a sua heterogeneidade de substratos. Estima-se que há um milhão de espécies de bactérias em 30 gramas de solos florestais e que haverá pelo menos um bilhão de espécies em todo o mundo. Apesar de constituírem somente de 1 a 4% do carbono total e ocuparem menos de 5% do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade de micro-organismos nesse ambiente é bastante elevada. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, somente 15 a 30% das bactérias e 10% dos fungos se encontram em estado ativo. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo. A diversidade microbiana se encontra diretamente relacionada com um conjunto de fatores abióticos (atmosfera, temperatura, água, pH, potencial redox, fontes nutricionais, entre outros) e bióticos (genética microbiana, a interação entre os micro-organismos, entre outros), que permite o desenvolvimento microbiano e a estruturação da comunidade viva dos solos. A interação entre esses fatores influencia diretamente a ecologia, a atividade e a dinâmica populacional de micro-organismos no solo. Muitas transformações críticas dos principais ciclos biogeoquímicos da biosfera ocorrem nos solos e são facilitadas pelos organismos que nele vivem. Apesar da importância de todos os micro-organismos que compõem a microbiota dos solos, esse trabalho tratará mais detalhadamente da comunidade bacteriana desse ambiente e o seu papel no desenvolvimento das plantas e nos ciclos biogeoquímicos. Além disso, esse trabalho aborda os principais métodos de análise de comunidades bacterianas dos solos mais utilizados atualmente.

Palavras-chave: bactérias promotoras do crescimento vegetal, diversidade microbiana, microbiota, nitrogênio, sequenciamento

1 - Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (danielaritlee@gmail.com, prangelcarol@hotmail.com, n.varrgas@gmail.com, karenthomeny@gmail.com, luciane.passaglia@ufrgs.br)



Abstract: *Microorganisms are present everywhere on Earth that supports life. Soils have a higher amount and bacterial diversity than water or air, due to their heterogeneity of substrates. It is estimated that there are one million species of bacteria in 30 grams of forest soils and that there will be at least one billion species worldwide. Although they constitute only 1 to 4% of the total carbon and occupy less than 5% of the porous space of the soil, the diversity and number of microorganisms in this environment is quite high. However, as soil is usually a stressful environment, limited by nutrients, only 15 to 30% of bacteria and 10% of fungi are in an active state. Living microbial soil components are also called microbial biomass and bacteria and fungi account for about 90% of soil microbial activity. Microbial diversity is related to a set of abiotic factors (atmosphere, temperature, water, pH, redox potential, nutritional sources, among others) and biotics (microbial genetics, the interaction between microorganisms, among others), which allows microbial development and the structuring of the living community of soils. The interaction between these factors directly influences the ecology, activity, and population dynamics of microorganisms in the soil. Many critical transformations of the main biogeochemical cycles of the biosphere occur in soils and are facilitated by the organisms that live in it. Despite the importance of all microorganisms that make up the soil microbiota, this work will deal in more detail with the bacterial community of this environment and its role in plant development and biogeochemical cycles. In addition, this work addresses the main methods of analysis of soils bacterial communities currently used.*

Keywords: *bactérias promotoras do crescimento vegetal, diversidade microbiana, microbiota, nitrogênio, sequenciamento*

Introdução

Em todos os lugares da Terra que suportam a vida encontramos micro-organismos. Isso inclui habitats que nos são familiares, como solo, água e ar, bem como ambientes extremos. Bactérias extremófilas, por exemplo, podem habitar locais inóspitos como vulcões, lagos congelados ou águas extremamente salinas. Essas bactérias não só toleram condições extremas, mas, muitas vezes, precisam desse tipo de ambiente para se multiplicarem¹. Os solos apresentam maior quantidade e diversidade bacteriana do que a água ou o ar, devido a sua heterogeneidade de substratos. Estima-se que há um milhão de espécies de bactérias em 30 gramas de solos florestais e que haverá, pelo menos, um bilhão de espécies em todo o mundo^{2,3}.

Micro-organismos do solo, em conjunto com a biota total e, especialmente, com a vegetação superior, constituem, junto com clima, topografia, material de origem parental e tempo, um dos cinco fatores que interagem na formação do solo. Os micro-organismos do solo, também chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos, com diversidade e quantidade bastante elevadas: bactérias, actinomicetos, fungos (ver **Quadro 1**), algas e protozoários. Esses grupos respondem por 1 a 4% do carbono total e ocupam menos de 5% do

espaço poroso do solo. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado de nutrientes, somente 15 a 30% das bactérias e 10% dos fungos se encontram em estado ativo⁴.

Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo⁵. Essa atividade é um dos grandes mediadores da formação do solo e estabilização de seus agregados⁶, de tal forma que a presença de micro-organismos faz parte da definição de “solo”. Os agregados são formados por diferentes proporções de areia, argila e silte que funcionam como um suporte físico para a aderência microbiana e proporcionam condições diferenciadas de aeração e disponibilidade de nutrientes, os quais possibilitam a coexistência de milhares de micro-organismos, com diferenciadas habilidades metabólicas (**Figura 1**)⁷. Além disso, a microbiota dos solos pode ser um fator determinante no controle da diversidade da flora e da fauna, acima ou abaixo dele^{8,9}.

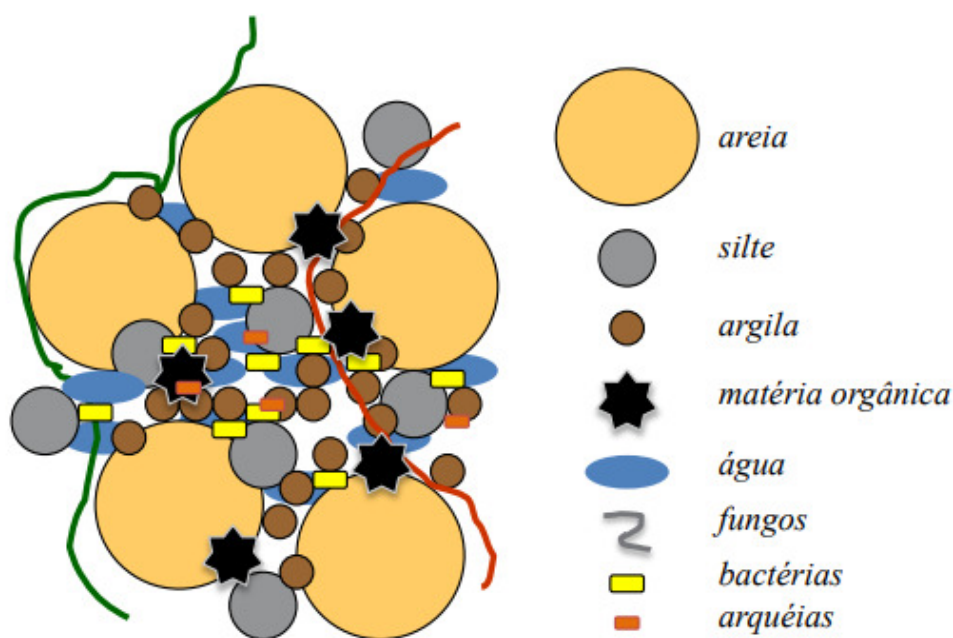


Figura 1. Esquema da estrutura, composição e organização de um agregado de solo. Adaptado de Cotta, 2016⁷.

A diversidade microbiana se encontra diretamente relacionada com um conjunto de fatores abióticos (atmosfera, temperatura, água, pH, potencial redox, fontes nutricionais, entre outros) e bióticos (genética microbiana, a interação entre os micro-organismos, entre outros), que permite o desenvolvimento microbiano e a estruturação da comunidade viva dos solos. A interação entre

esses fatores influencia diretamente a ecologia, a atividade e a dinâmica populacional de micro-organismos no solo⁷ e evidencia a importância de estratégias ambientais sustentáveis que visem a manutenção e a conservação da diversidade e funcionalidade da comunidade microbiana nesse ambiente.

Quadro 1. Os fungos, outro grupo importante de micro-organismos do solo

Devido à sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares, os fungos são capazes de quebrar todos os tipos de matéria orgânica, decompondo os componentes do solo e, assim, regulando o equilíbrio de carbono e nutrientes^a. Os fungos convertem matéria orgânica morta em biomassa, dióxido de carbono e ácidos orgânicos. Muitas espécies de fungos possuem a capacidade de agir como bioabsorventes eficazes de metais tóxicos, como cádmio, cobre, mercúrio, chumbo e zinco, acumulando-os em seus corpos frutíferos, embora esses elementos possam inibir seu crescimento e afetar sua reprodução^a. Os fungos podem ser encontrados em quase todos os ambientes e podem viver em uma ampla faixa de pH e temperatura^a.


Micorrizas arbusculares são associações simbióticas mutualistas formadas entre fungos zigomicetos da ordem Glomales^b e raízes da maioria das plantas superiores. Com base na ocorrência generalizada dessa associação, Marx e Brian, em 1975, postularam que “plantas não possuem raízes, mas sim micorrizas”. Os fungos micorrízicos arbusculares estabelecem uma relação simbiótica com a planta, caracterizada pela penetração do micélio fúngico inter e intracelularmente às raízes, sem causar nelas modificações morfológicas^c. Nas associações micorrízicas ocorre estreita interação entre os parceiros, apresentando uma perfeita integração morfológica e fisiológica, o que resulta em uma alta compatibilidade funcional. A planta se beneficia do aumento da absorção de água e nutrientes, principalmente de fósforo, proporcionado pelas hifas fúngicas, que funcionam como uma extensão do sistema radicular, enquanto o fungo é beneficiado pelos fotoassimilados das plantas, que permitem o completo ciclo de vida destes que só ocorre em associação com a planta hospedeira^c.

^a Frac, M., Hannula, S.E., Belka, M., Jedryczka, M. 2018. Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology* 9:707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>

^b Colozzi, Nogueira, M.A. 2007. Micorrizas arbusculares em plantas tropicais: café, mandioca e cana-de-açúcar. In: Silveira, A.P.D., FREITAS, S.S. (eds). *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*, p. 38-56. Instituto Agrônomo, Campinas, 2007.

^c Folli-Pereira, M.S., Meira-Haddad, L.S., Bazzolli et al. 2012. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo* 36 (6): 1663–1679. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832012000600001>

Muitas transformações críticas dos principais ciclos biogeoquímicos da biosfera ocorrem nos solos e são facilitadas pelos organismos que nele vivem¹⁰. Os protozoários também desempenham papéis importantes nos ciclos do carbono e do nitrogênio em muitos solos, regulando a taxa de decomposição e vias metabólicas específicas¹⁰. Apesar da importância de todos os micro-organismos que compõem a microbiota dos solos, esse trabalho tratará mais detalhadamente da




comunidade bacteriana desse ambiente, abordando suas contribuições para o desenvolvimento de plantas e nos ciclos biogeoquímicos de muitos elementos químicos importantes para a manutenção da vida.

Bactérias do solo

A ciclagem de nutrientes permite que várias formas de um mesmo elemento estejam disponíveis no ambiente, garantindo que os elementos essenciais à vida não tenham seus estoques esgotados⁶. A assimilação e excreção de formas orgânicas e inorgânicas dos diversos elementos é o que permite que os nutrientes não fiquem acumulados em um só estado ou disponíveis apenas para um grupo de organismos. As bactérias são organismos que metabolizam substratos complexos, sintetizam substâncias com diversos usos, além de desempenharem papel fundamental na ciclagem de nutrientes do planeta. Desta maneira, muitas bactérias do solo possuem efeitos positivos para as plantas. Tal efeito é mediado por uma série de mecanismos, incluindo melhoria da nutrição mineral, aumento da tolerância da planta aos estresses bióticos e abióticos, modificação do desenvolvimento da raiz, bem como supressão de doenças transmitidas pelo solo^{11,12,13}. A comunidade bacteriana que interage diretamente com as raízes das plantas é muito complexa e dinâmica, de tal forma que as bactérias e as plantas estão em constante comunicação. Essa relação pode mudar de acordo com as condições ambientais e a presença de outras bactérias¹⁴.

As bactérias do solo produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários que têm diversas propriedades físico-químicas e biológicas. Os metabólitos secundários são compostos que não estão diretamente envolvidos no desenvolvimento ou multiplicação das bactérias produtoras, mas podem desempenhar papéis ecológicos importantes nas interações com outros organismos¹⁵. Entretanto, apesar da importância desses compostos, apenas uma pequena fração de bactérias foi cultivada e estudada quanto à sua capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos. Peptídeos não ribossômicos (NRPs, do inglês *nonribosomal peptide*) e policetídeos (PKs, do inglês *polyketides*) estão entre as famílias mais abundantes de metabólitos secundários, abrangendo numerosos compostos com diversas funções, incluindo sideróforos, envolvidos em remoção de ferro, pigmentos que fornecem proteção contra uma variedade de fatores de estresse, moléculas de comunicação e antimicrobianos¹⁶.

O início dos estudos da bioquímica do solo foi marcado pelo isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como *Rhizobium*, realizado pelo microbiologista holandês Martinus Beijerinck, no ano de 1888, e pelo estabelecimento dos princípios de nitrificação e o modo de vida autotrófico, pelo pesquisador russo Sergei Winogradsky, em 1890. Já no século XX, muitos fatores que influenciam a bioquímica e a microbiologia do solo foram elucidados. Entre esses, destacamos a influência científica da engenharia genética, o conhecimento que processos biológicos



são afetados pelos principais problemas ambientais e a necessidade de desenvolvimento de uma agricultura e sistemas de manejo florestais altamente eficientes com relação à produção sustentável. Para atingir o objetivo desta produção agrícola sustentável, há necessidade de envolver a bioquímica e a microbiologia do solo com a biotecnologia, visando realizar a aplicação tecnológica da capacidade dos micro-organismos⁴.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Várias abordagens químicas, que foram aplicadas com sucesso em décadas passadas para o aumento da produção e produtividade agrícola, irremediavelmente prejudicaram o meio ambiente, incluindo degradação da terra; poluição do solo, da água e do ar; bem como diminuição da biodiversidade. Portanto, surgiu a necessidade de se descobrir novidades ecológicas e estratégias de enfrentamento acessíveis para reduzir os estresses abióticos globais que ameaçam a agricultura, sem causar a diminuição na oferta de alimentos. Perdas de rendimento causadas por estresses abióticos (como temperaturas extremas, seca, salinidade, toxicidade de poluentes, alta intensidade de luz, radiação UV, herbicidas e estresses oxidativos) comprometeram de 50-82% do rendimento bruto das lavouras nos últimos anos e representam um sério perigo para a indústria agrícola e segurança alimentar global¹⁷. Para diminuir os impactos prejudiciais de diferentes estresses abióticos sobre crescimento e desenvolvimento da planta, algumas soluções foram desenvolvidas, por exemplo, engenharia e melhoramento genético de plantas e aplicação de linhagens benéficas de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*)^{18 19}.

As PGPB costumam se associar à rizosfera das plantas, uma fina camada que está sob a influência de compostos que as plantas liberam por suas raízes, chamados de exsudatos²⁰. Esses exsudatos são ricos em carbono e nitrogênio e apresentam certo grau de seletividade para facilitar a multiplicação e o estabelecimento de algumas bactérias^{14,21}, muitas das quais exercem funções benéficas às plantas. Dentre as principais funções das PGPB podemos citar o fornecimento de nutrientes; controle ou inibição da ação de patógenos; estímulo ao crescimento vegetal, através da produção de fito-hormônios; melhoramento da estrutura do solo; e a ajuda na fitorremediação de solos contaminados^{14,22,23} (ver **Quadro 2**). Alguns exemplos de bactérias promotoras de crescimento de plantas são encontrados nos gêneros *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*²⁴. Essas PGPB têm sido empregadas como inoculantes para promoção de crescimento e aumento de rendimento em plantas e, também, para manter a produtividade do solo e a disponibilidade de nutrientes²⁴.

As PGPB podem agir no crescimento das plantas de forma direta ou indireta (**Figura 2**). Indiretamente, essas bactérias podem inibir a ação deletéria de patógenos, como, por exemplo,

pela produção de sideróforos, moléculas que solubilizam e sequestram ferro²⁵. Neste caso, as PGPB, ao retirarem o ferro do ambiente, acabam promovendo uma competição entre elas e os patógenos por esse elemento. Ainda de forma indireta, as bactérias benéficas podem fazer o controle biológico de patógenos de planta no solo pela produção de antibióticos²². As PGPB simbióticas e não-simbióticas podem ajudar o crescimento das plantas de forma direta, através da produção de fito-hormônios (auxinas, giberelinas, etileno, citocininas e ácido abscísico), realização da fixação biológica do nitrogênio; solubilização e mobilidade de minerais, tais como o fósforo e ferro, entre outros^{22,23}.

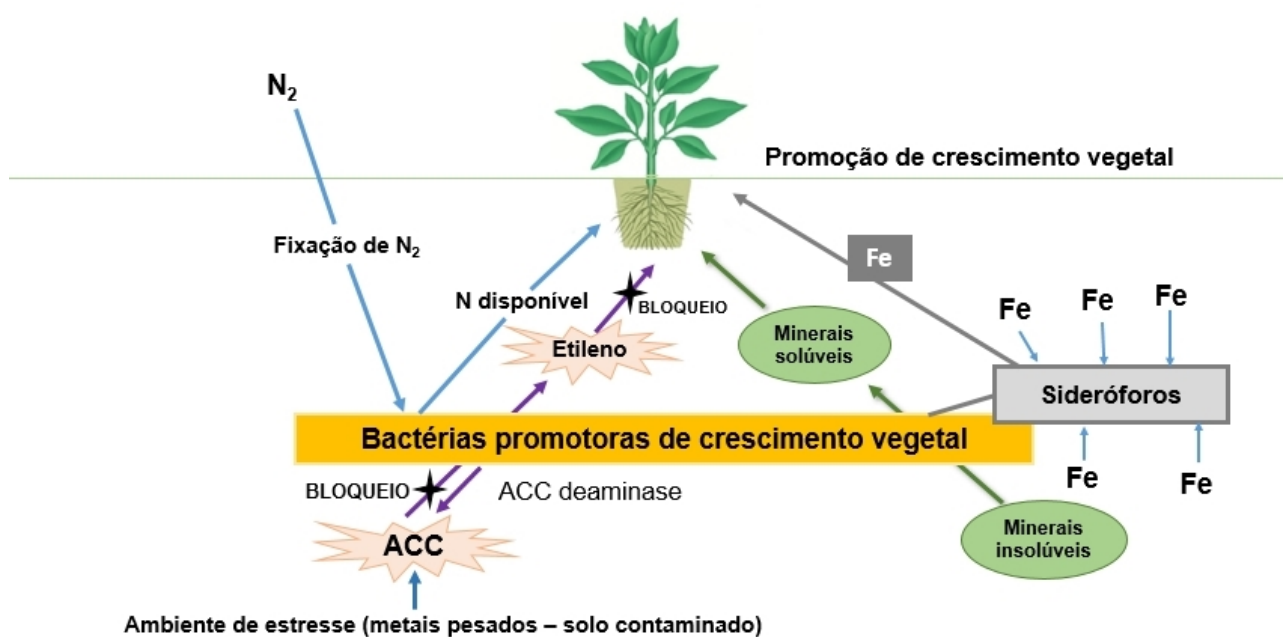


Figura 2. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal utilizados pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB), alguns discutidos no texto em maiores detalhes. Fe = ferro, ACC = 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato. Adaptado de Lugtenberg e Kamilova, 2009¹³¹.

Formas diretas de atuação das PGPB no crescimento das plantas

Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A atmosfera da Terra é composta principalmente de nitrogênio (78%). Entretanto, o nitrogênio atmosférico (N_2) é relativamente inerte às plantas e poucos são os organismos que conseguem utilizá-lo. Até 1908, as bactérias eram responsáveis pela fixação de cerca de 90% do nitrogênio do planeta. Após o conhecimento deste fato, o alemão Fritz Haber desenvolveu uma metodologia capaz de converter o nitrogênio molecular em compostos orgânicos reativos sem a participação destes micro-organismos²⁶. Embora utilizado na fabricação de fertilizantes, o processo de Haber

exige a temperatura de 500°C e a pressão de 300 atmosferas para que ocorra a quebra da ligação entre os átomos de N, o que o torna bastante caro e difícil de ser executado.

As bactérias capazes de fixar o nitrogênio (chamadas de diazotróficas) possuem um complexo enzimático, denominado de nitrogenase, que combina o N₂ com o hidrogênio e produz uma forma assimilável de nitrogênio (a amônia). Esse processo é chamado de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). Os genes responsáveis pela síntese e funcionamento da nitrogenase são denominados genes *nif* e incluem, além dos genes estruturais para a montagem da enzima, genes envolvidos na biossíntese do cofator presente no sítio ativo (normalmente composto por ferro e molibdênio), genes para a doação de elétrons ao processo e genes reguladores, já que o processo de FBN apresenta um alto gasto energético para a bactéria²⁷. A relevância do processo de FBN se dá, além da redução dos custos com adubos nitrogenados, pela importância do nitrogênio como um elemento vital, aumentando a produtividade das plantas.

Algumas espécies de bactérias diazotróficas têm vida livre, enquanto outras são simbioses benéficas que vivem dentro das plantas^{27,28}. A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN, pois, desde que foram realizados programas para o incremento da fixação de N₂, que resultaram no desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Bradyrhizobium*, poucas aplicações de fertilizantes nitrogenados são realizadas nas lavouras atualmente²⁸.

Solubilização de fosfatos

O fósforo (P) é um macronutriente importante e necessário para a fotossíntese, transdução de sinal, transferência de energia, biossíntese de macromoléculas e respiração. Embora a quantidade de P no solo varie entre 400 e 1.200 mg kg⁻¹ de solo, a concentração de P solúvel nesse ambiente é, tipicamente, de apenas 1 mg kg⁻¹ ou menos²⁹; ou seja, a maior parte do P que está presente no solo se encontra de forma insolúvel, seja em formas minerais, como apatita, hidroxiapatita e oxiapatita, ou em formas orgânicas, como fosfato de inositol, fosfomonoésteres, fosfodiésteres e fosfotriésteres³⁰.

Por se encontrar em baixa disponibilidade em solos tropicais, grandes doses de adubos fosfatados (NPK) são aplicadas para que as culturas obtenham alta produtividade. É bastante comum o uso de fertilizantes de baixa solubilidade, para reduzir o custo de implantação de lavouras perenes. Esses solos, frequentemente, apresentam alta capacidade de fixação de P, em virtude da abundância de óxi-hidróxidos de ferro e alumínio, que formam fosfatos estáveis³¹. A disponibilidade de P solúvel para as raízes das plantas é influenciada pela atividade dos micro-organismos do solo. As PGPB tornam o fósforo disponível para as plantas ao promoverem a solubilização de fosfatos, auxiliada pela liberação de compostos absorventes de minerais e liberação de enzimas extracelulares para mineralização de fosfato. Os fosfatos inorgânicos do solo [por exemplo, Ca₃(PO₄)₂] são solubilizados pela produção de sideróforos e ácidos orgânicos por PGPB²⁸.

Quadro 2: A fitorremediação e impactos ambientais associados ao solo

O intenso aumento da população mundial gera uma busca cada vez maior de alimentos, espaço e condições para sobrevivência, fazendo com que as ações antrópicas ao meio ambiente sejam, ao longo do tempo, cada vez maiores^a. As atividades antrópicas voltadas para a mineração, indústria metalúrgica, indústrias químicas, agricultura, dentre outras, têm causado distúrbios na biosfera, ao liberar rejeitos orgânicos como hidrocarbonetos, inorgânicos e metais pesados presentes em grande parte dos rejeitos industriais^b. Nesse modelo agrícola, o uso de adubos industriais, herbicidas e inseticidas tem poluído o ambiente, além de contaminar os alimentos com substâncias tóxicas. A monocultura, adotada nesse modelo, além de ser dependente de constantes intervenções geradoras de poluição e erosão do solo, provoca a redução da biodiversidade local e, em muitos casos, compromete o patrimônio genético da agricultura^c.

Nesse contexto, aumenta o interesse pela utilização da biorremediação, caracterizada como uma técnica que objetiva descontaminar solo e água por meio da utilização de organismos vivos, como micro-organismos e plantas^d. Uma das técnicas mais estudadas e que mais se destaca dentro da biorremediação *in situ* é a fitorremediação^e. A técnica da fitorremediação consiste na utilização de plantas que possuem capacidade de absorver elementos do solo com teores excessivos de metais e outros elementos potencialmente tóxicos ao meio, promovendo sua descontaminação^f. A fitorremediação é compreendida por cinco mecanismos: os considerados diretos, que se dividem em fitoextração, fitotransformação e fitovolatilização; e os mecanismos indiretos, como fitoestabilização e fitoestimulação^g. A ocorrência de áreas degradadas torna-se cada vez mais frequente e preocupante, portanto, a fitorremediação é uma alternativa capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota com a finalidade de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos^c.

^a Alves, M.C. 2006. Recuperação dos solos degradados pela agricultura. In: Encontro nacional sobre educação ambiental na agricultura, 5., Anais. Instituto Agrônomo, Campinas.

^b Bhargava, A., Carmona, F.F, Bhargava, M., & Srivastava, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*: 105: 103-120. doi:10.1016/j.jenvman.2012.04.002.

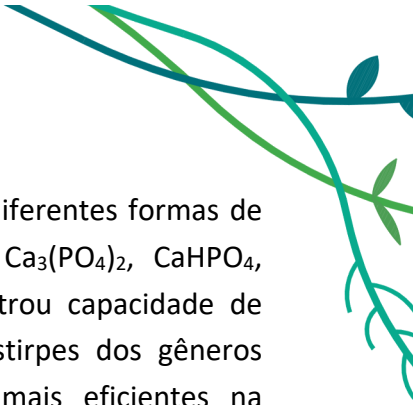
^c Coêlho, J.G.S., Araújo, J., Lima, A.K.V.O., Pereira, F.C. Fitorremediação na recuperação de áreas degradadas e combate à desertificação: Estado da arte. I Congresso Internacional das Ciências Agrárias - COINTER, PDV Agro, 2016.

^d Pires, F.R., Souza, C.M., Cecon, P.R. et al. 2005 Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29 (4): 627-634.

^e Coutinho, H. D.; Barbosa, A. R. 2007. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. *Silva Lusitana* 15 (1): 103-117.

^f Souza, L.A., Andrade, S.A.L., Souza, S.C.R. 2011. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium atherimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 35 (3): 1441-1451.

^g Tavares, S. 2009. Fitorremediação em solo e água de áreas contaminadas por metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos. Tese (Programa de Engenharia Civil). 415f. UFRJ, Rio de Janeiro.



Como exemplos de micro-organismos do solo capazes de solubilizar diferentes formas de fosfatos inorgânicos podemos citar *Penicillium radicum*, que solubilizou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e AlPO_4 em meio líquido³² e *Penicillium rugulosum*, que mostrou capacidade de solubilizar fosfatos através da produção de ácido glucônico e cítrico³³. Estirpes dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* também estão entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P^{34} , enquanto com relação aos fungos destacam-se estirpes pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*³⁵.

Produção de sideróforos

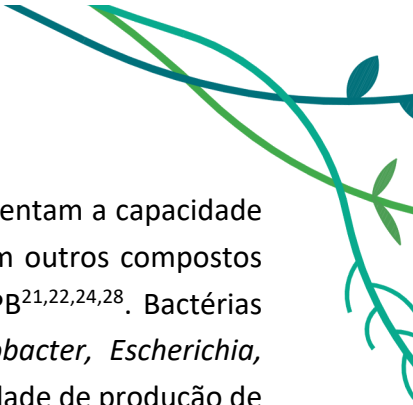
Os sideróforos são metabólitos secundários e agentes quelantes de ferro produzidos por diferentes organismos (como bactérias, fungos e plantas) a fim de absorver o ferro de seu ambiente circundante, disponibilizando esse elemento essencial para as células. No ambiente aeróbio, o ferro existe na forma de hidróxidos e óxidos de ferro, o que reduz sua disponibilidade para as plantas. Os sideróforos produzidos e liberados por bactérias que colonizam a rizosfera liberam o ferro das fases minerais, tornando-o acessível às plantas. Assim, as plantas recebem complexos solúveis de Fe^{3+} , que podem ser ativamente transportados para o sistema vegetal.

Outra vantagem da produção de sideróforos por PGPB é que bactérias patogênicas não conseguem obter esse metal, e, assim, as PGPB promovem, indiretamente, o crescimento das plantas³⁶. Atualmente, várias linhagens bacterianas têm sido relatadas por sua capacidade de controlar doenças de plantas por meio da produção de sideróforos, limitando o crescimento e a colonização de micro-organismos fitopatogênicos dependentes de ferro³⁷.

Produção de hormônios vegetais

Os hormônios vegetais, mais conhecidos como fitohormônios, são substâncias orgânicas derivadas de vias biossintéticas das plantas que atuam em determinados órgãos, como folhas, caule, raiz, flores e frutos, auxiliando no crescimento e desenvolvimento vegetal. Eles podem atuar no local de sua síntese ou serem transportados para algum outro local dentro do corpo da planta para mediar as respostas de crescimento e desenvolvimento em condições ambientais estressantes³⁸. Entre os fitohormônios mais conhecidos e estudados estão o ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, auxinas, citocininas (CKs) e brassinosteroides (BRs)³⁹.

O ácido indol-3-acético (AIA, uma das auxinas mais estudadas), por exemplo, tem grande importância quando se trata de crescimento de plantas, pois ele tem a capacidade de induzir o alongamento celular em regiões subapicais que sintetizam tecidos meristemáticos, como gemas em brotamento de folhas jovens, de extremidades de raízes, flores e inflorescências. Quando se trata de células, o AIA é capaz de promover a sua expansão, por estar envolvido na incorporação de materiais da parede celular⁴⁰.



Alguns micro-organismos, tais como bactérias e fungos, também apresentam a capacidade de produzir o AIA. Em bactérias, esse hormônio é produzido juntamente com outros compostos indólicos e é um regulador de crescimento bastante explorado entre as PGPB^{21,22,24,28}. Bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Grimontella*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Rahnella* demonstraram uma grande capacidade de produção de compostos indólicos e vários estudos demonstraram o potencial de determinadas linhagens em promover o crescimento vegetal ou conferir proteção contra organismos patogênicos²⁸.

Formas indiretas de atuação das PGPB no crescimento das plantas

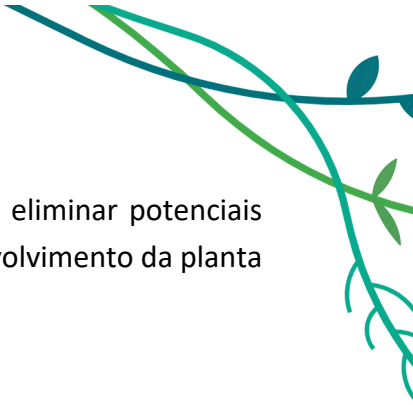
Controle biológico

Em um esforço para diminuir o uso generalizado de produtos químicos como meio de prevenir os danos de fitopatógenos às plantas, os cientistas têm desenvolvido o uso de certas PGPB ambientalmente amigáveis como agentes de biocontrole^{41,42}, com muitos desses organismos já disponíveis comercialmente⁴³.

Algumas PGPB possuem o potencial de controle biológico, especificamente contra invertebrados, como insetos e nematoides, protegendo a planta do ataque desses organismos. Esta defesa se dá por meio da ação de diversos mecanismos, incluindo a produção de uma variedade de toxinas, de fatores de virulência e de metabólitos, que são capazes de deter a atividade de pragas. Estudos recentes destacam o envolvimento de diversos compostos bioativos, como toxinas proteicas específicas (quitinases e proteases) que atuam com frequência no intestino médio de insetos degradando barreiras externas ou a matriz peritrófica deste órgão, e vários metabólitos secundários, que visam diferentes tecidos⁴⁴. O cianeto de hidrogênio (HCN), por exemplo, é um desses produtos. A dissociação do HCN origina o íon cianeto, que é um potente inibidor de muitas metaloenzimas, particularmente de citocromo C oxidases contendo cobre⁴⁵. Portanto, a produção de HCN por PGPB pode promover uma importante redução de fitopatógenos e de rizobactérias prejudiciais com a melhoria correspondente da saúde das plantas⁴⁶.

Além de sintetizar uma série de compostos antibióticos e enzimas com atividade antagônica aos fitopatógenos, bactérias endofíticas (que vivem dentro do tecido vegetal) também podem acionar o sistema de defesa inato das plantas, conhecido como resistência sistêmica induzida (ISR do inglês *Induced Systemic Resistance*)^{24,47}. Bactérias com estas características pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia* e *Streptomyces*⁴⁷.

O momento ideal para a aplicação de uma PGPB para suprimir a atividade de fitopatógenos pode ocorrer em dois períodos da colheita do vegetal: antes (pré-colheita) ou depois (pós-colheita).



Normalmente, o período de pré-colheita pode incluir ações profiláticas para eliminar potenciais patógenos que residem no solo agrícola, bem como durante o plantio e desenvolvimento da planta até a obtenção do fruto, semente ou produto vegetal³⁷.

Produção de antibióticos

PGPB tendem a apresentar genes, cujos produtos conferem resistência a antibióticos e a metais. A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser uma propriedade intrínseca ou ser adquirida. A presença de genes de resistência é apoiada por análises filogenéticas de alguns genes envolvidos na resistência a antibióticos, as quais sugerem uma longa história evolutiva originada antes da “era dos antibióticos”⁴⁸. A resistência adquirida a antibióticos pode resultar de mutações em genes ou da aquisição de genes de resistência de outros organismos por transferência gênica horizontal. Infelizmente, ainda há uma carência enorme de informações sobre o significado biológico da resistência a antibióticos pelas PGPB³⁶.

O principal mecanismo usado pelas PGPB para combater os efeitos deletérios dos fitopatógenos é a síntese de um ou mais antibióticos⁴³. No entanto, um antibiótico que é reconhecido por controlar um patógeno, evitando assim os danos à planta daquele patógeno, pode não ser tão eficaz contra outro patógeno na mesma planta. Além disso, a PGPB que sintetiza um determinado antibiótico pode mostrar diferenças variáveis em suas ações em diferentes condições de campo. A atividade de uma bactéria de biocontrole também pode ser alterada pelo método de cultivo desta no laboratório e na formulação do inoculante a ser empregado no biocontrole, antes mesmo do uso e do modo de aplicação desse produto⁴³.

A utilização de antagonistas microbianos contra patógenos de culturas vegetais foi proposta como uma alternativa aos pesticidas químicos. PGPB pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* desempenham um papel ativo na supressão de micro-organismos patogênicos produtores de antibióticos. Esses antagonistas bacterianos impõem a supressão de patógenos de plantas pela secreção de metabólitos extracelulares que são inibitórios mesmo em baixas concentrações⁴⁹.

A disponibilidade de fontes de carbono determina a produção de antibióticos nas rizobactérias⁵⁰. Antagonismo microbiano, comumente demonstrado pelo desenvolvimento de uma zona de inibição entre os dois organismos quando co-cultivados em um meio de crescimento sólido, é a base para a seleção de micro-organismos que produzem antibióticos⁵¹. Algumas enzimas, como proteases, quitinases, glucanases, antibióticos peptídicos e pequenas moléculas podem ser secretadas por várias espécies e muitas contribuem para a supressão de patógenos. Antibióticos peptídicos e vários outros compostos tóxicos para patógenos de plantas foram recuperados de várias linhagens de *Bacillus*⁵¹. Muitos compostos antifúngicos foram identificados como micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas e subsporinas⁵¹.

Bactérias e seu Papel nos Ciclos Biogeoquímicos

Ciclo biogeoquímico é o caminho pelo qual os elementos, compostos químicos e outras formas de matéria são passados de um organismo para outro ou de uma parte da biosfera para outra. Embora a macrofauna do solo também participe dos processos de reciclagem, a maioria desses processos é realizada por micro-organismos, como bactérias, arqueias, fungos e protozoários^{52,53}. A alteração desses ciclos de nutrientes pode levar a graves desequilíbrios para o ambiente, com sérias consequências ambientais, econômicas e de saúde pública⁵⁴.

Recentemente, as bactérias estão sendo usadas no solo para a mineralização de poluentes orgânicos, ou seja, biorremediação de solos poluídos^{55,56,57}, ou para um maior aporte de nutrientes⁵⁸. Espécies de rizóbios, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium* têm sido utilizadas com sucesso em todo o mundo devido ao estabelecimento de uma simbiose eficaz com leguminosas para a realização da fixação biológica de nitrogênio^{58,59}. Por outro lado, bactérias fixadoras de nitrogênio não simbióticas, como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* e *Klebsiella* também estão sendo utilizadas para inocular uma grande área de terra arável no mundo com o objetivo de aumentar a produtividade das plantas⁶⁰. Além disso, bactérias solubilizadoras de fosfato, como as espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus*, são aplicadas nos solos para melhorar especificamente o status de fósforo das plantas⁶¹.

Nitrogênio

O nitrogênio fixado através da FBN eventualmente é convertido de volta em gás nitrogênio pelos micro-organismos do solo através de três etapas: amonificação, nitrificação e desnitrificação (**Figura 3**)⁶². Em ecossistemas terrestres, a primeira etapa é a amonificação, no qual certas bactérias e fungos convertem resíduos nitrogenados de animais vivos ou restos de organismos mortos em amônia (NH₃). Na etapa subsequente, essa amônia é, então, oxidada em nitrito (NO₂) e depois em nitrato (NO₃), pelas bactérias do solo, através do processo de nitrificação. Por fim, ocorre o processo de desnitrificação, pelo qual as bactérias do solo usam o nitrato como um receptor de elétrons terminal na respiração anaeróbica, convertendo-o em gás nitrogênio, que entra novamente na atmosfera^{52 63}. Devido à sua importância ecológica e econômica, o ciclo do nitrogênio é um dos ciclos biogeoquímicos mais estudado pela comunidade científica, assim como os mecanismos pelos quais as bactérias realizam a fixação deste elemento^{13,28,64}.

Fósforo

Nem plantas nem animais podem viver sem fósforo (P), um componente que é essencial para a composição orgânica do trifosfato de adenosina (ATP), a “moeda de energia” que impulsiona a maioria dos processos bioquímicos. Entre os nutrientes, o fósforo perde apenas para o nitrogênio em seu impacto sobre a produtividade e saúde dos ecossistemas terrestres e aquáticos⁶⁵.

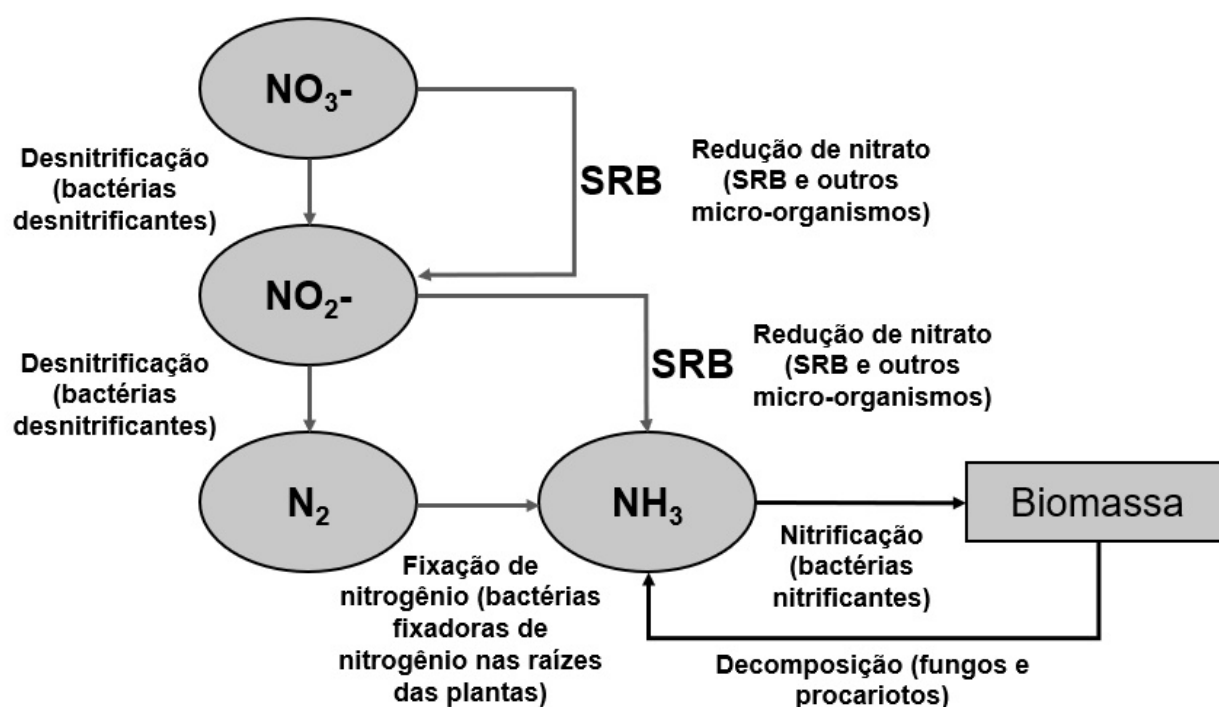


Figura 3. Visão esquemática do ciclo do nitrogênio. Desnitrificação: o nitrogênio é devolvido à atmosfera através de bactérias desnitrificantes que convertem nitratos presentes no solo. Fixação: bactérias fixadoras nas raízes das plantas transformam o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia e nitratos. Nitrificação: bactérias nitrificantes do solo transformam a amônia em nitratos. Decomposição: compostos orgânicos sofrem a ação de bactérias que os convertem em nitrato, amônia ou nitrogênio, sendo capazes de retornar o N à atmosfera. SRB = Bactérias redutoras de sulfatos (do inglês *Sulphate-Reducing Bacteria*). Adaptada de Dall'Agnol e Moura, 2014¹³².

O ciclo do fósforo consiste, basicamente, na conversão de uma forma inorgânica para uma orgânica e vice-versa, não havendo intermediário gasoso (**Figura 4**). Nos seres vivos, este elemento ocorre tanto em formas orgânicas (ácidos nucleicos, fosfolipídios etc.) como inorgânicas (fosfato). No entanto, grande parte do fósforo presente no solo encontra-se sob formas insolúveis e, consequentemente, indisponível para nutrição de plantas. Baixos níveis de P refletem a alta reatividade do fosfato com outros componentes solúveis³⁰, como alumínio, em solos com pH menor que 5, e cálcio, em solos com pH maior que 7. Bactérias solubilizadoras de fosfato solubilizam fosfatos inorgânicos do solo, como $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ e $AlPO_4$, através da produção de ácidos orgânicos, sideróforos e íons hidroxila^{23,66,67}.

Os micro-organismos desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo. Este ciclo ocorre por meio de oxidações e reduções cíclicas de compostos de fósforo, onde as reações de transferência de elétrons entre os estágios de oxidação variam de fosfina (-3) a fosfato ($+5$). Os

mecanismos genéticos e bioquímicos dessas transformações ainda não são completamente compreendidos⁶⁸. Existem populações consideráveis de bactérias solubilizadoras de fosfato no solo e nas rizosferas de plantas^{69,70,71,72}. Estas incluem linhagens aeróbicas e anaeróbicas, com prevalência de linhagens anaeróbicas em solos submersos⁷¹. Uma concentração consideravelmente maior de bactérias solubilizadoras de fosfato é comumente encontrada na rizosfera em comparação com solo não-rizosférico^{70,71}.

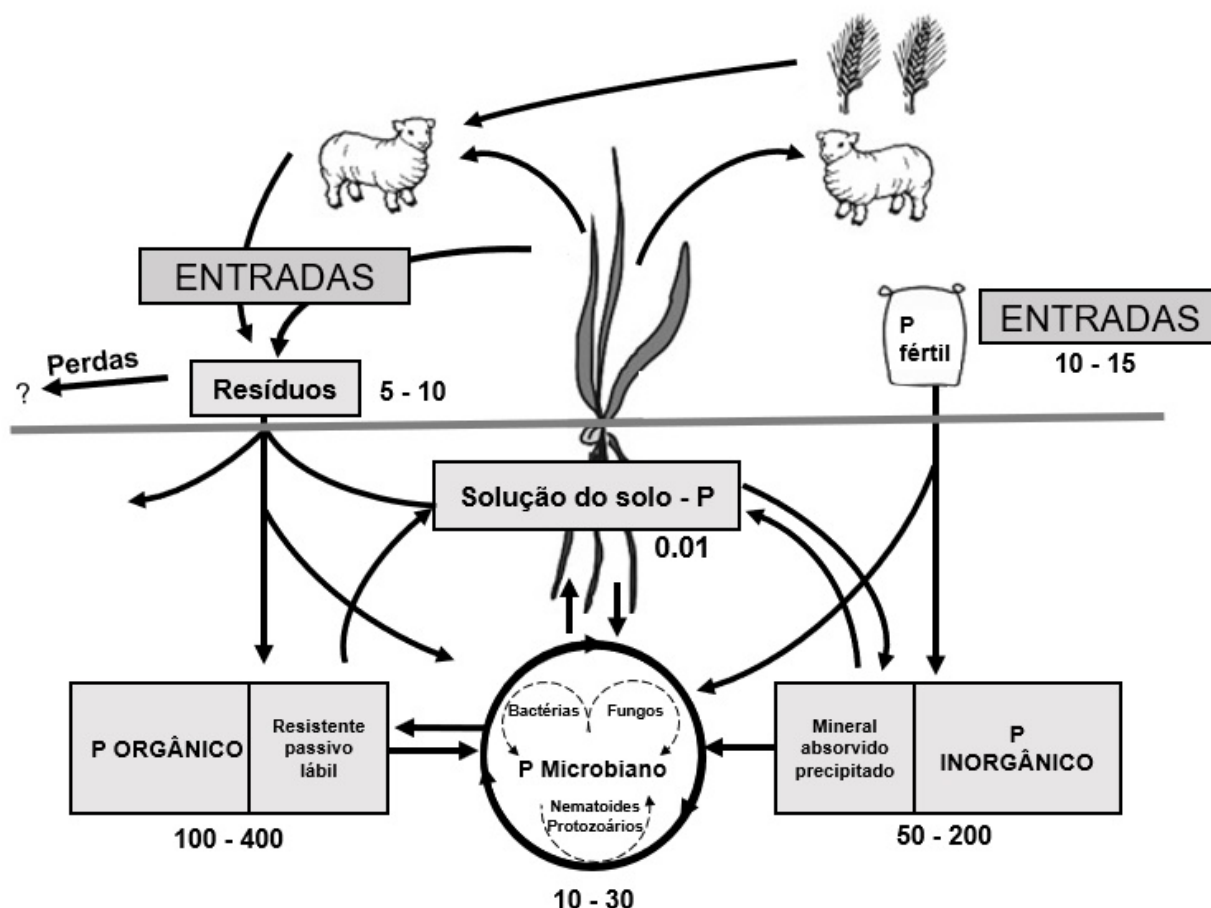


Figura 4. Diagrama esquemático dos principais componentes do ciclo do fósforo no solo. O fósforo se torna presente no solo a partir de processos de intemperismos. Os vegetais o utilizam para realização de atividades metabólicas e ele é transmitido para outros organismos via cadeia alimentar. O fósforo volta para o solo para ser reaproveitado, através da ação de micro-organismos que atuam na decomposição da matéria orgânica. Esses micro-organismos tornam o fósforo disponível na forma de um composto solúvel, que retorna para o ambiente. Números se referem a quantidades de fósforo, em μM , em cada situação. Adaptado de Richardson e colaboradores (2009)¹³³.

Enxofre

O enxofre (S), um macronutriente também essencial para a vida, faz parte da composição de aminoácidos, como cisteína e metionina, e está envolvido na formação de proteínas. A ciclagem do enxofre possui notável semelhança com a ciclagem do nitrogênio, nas quais ambos os elementos possuem a atmosfera como principal fonte; são mantidos, em grande parte, na matéria orgânica do solo; estão sujeitos a oxidação e redução microbiana; podem entrar e deixar o solo em formas gasosas, e estão sujeitos a algum grau de lixiviação na forma aniônica (**Figura 5**)⁶⁵.

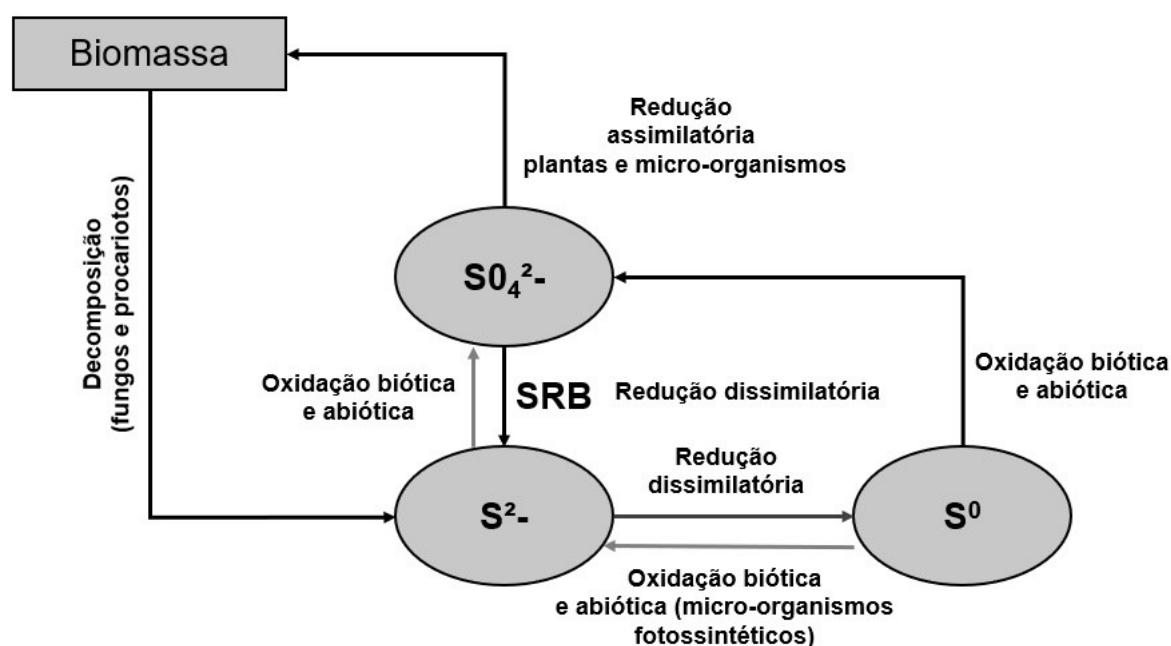


Figura 5. Visão esquemática do ciclo do enxofre. Através das chuvas, o enxofre entra em contato com o solo. Pela ação de micro-organismos ele é alterado para sulfato, se tornando disponível para as plantas. Outros organismos adquirem o enxofre através da cadeia alimentar, e, após sua morte, micro-organismos decompositores metabolizam esse sulfato, retornando ao solo. Assim que o nutriente se encontra na atmosfera, ele sofre processos de oxidação. SRB = Bactérias redutoras de sulfatos (do inglês *Sulphate-Reducing Bacteria*). Adaptada de Dall’Agnol e Moura (2014)¹³².

O enxofre é usado pelas plantas em quantidades semelhantes às do fósforo e possui grande importância como nutriente. No entanto, muitas vezes, esse elemento é esquecido nas discussões sobre o manejo da fertilidade do solo, que tendem a se concentrar apenas nas concentrações de N, P e potássio (K)⁷³. Em algumas áreas específicas, como no cerrado brasileiro, a deficiência de S nos solos pode ocorrer naturalmente^{74,75}.

Carbono

O carbono (C) é encontrado em todas as macromoléculas orgânicas e é um componente fundamental dos combustíveis fósseis. Na forma de dióxido de carbono (CO_2), o carbono é prontamente obtido da atmosfera, mas, antes de poder ser incorporado aos organismos vivos, ele deve ser transformado em uma forma orgânica utilizável. O ciclo do carbono consiste em dois processos principais: (1) fixação do CO_2 em matéria orgânica (como carboidratos, lipídeos e proteínas) por organismos autotróficos e (2) decomposição do carbono orgânico fixado em CO_2 por organismos heterotróficos (**Figura 6**)^{65,90}. Talvez o exemplo mais conhecido de fixação de carbono seja a fotossíntese, que, além de ser realizada por plantas, também é realizada por bactérias, como as cianobactérias. Já a obtenção de CO_2 a partir de carbono orgânico pode ser realizada tanto pela fermentação e respiração de organismos heterotróficos, como pela ação decompositora das bactérias e fungos^{65,76}.

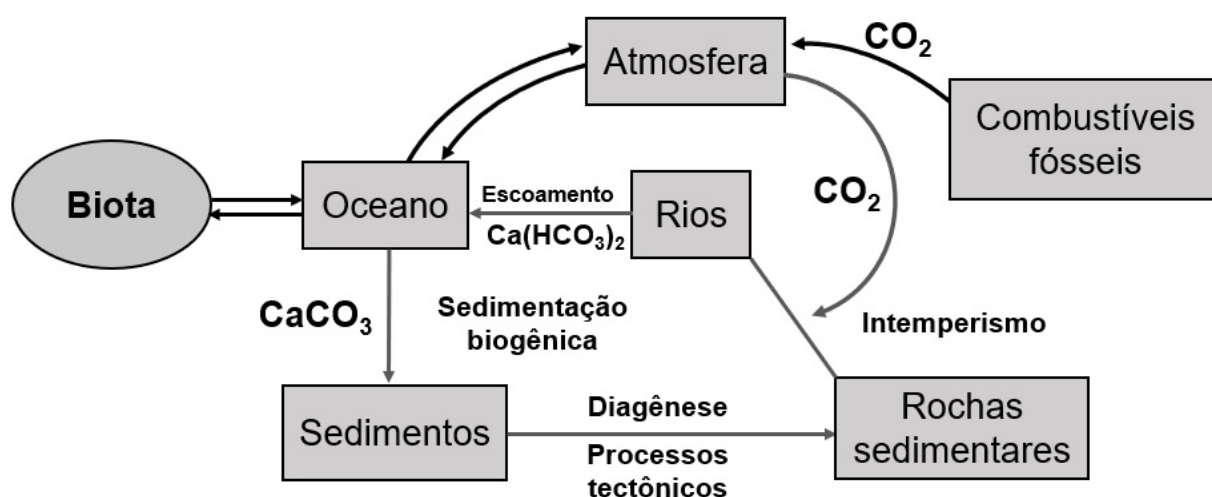
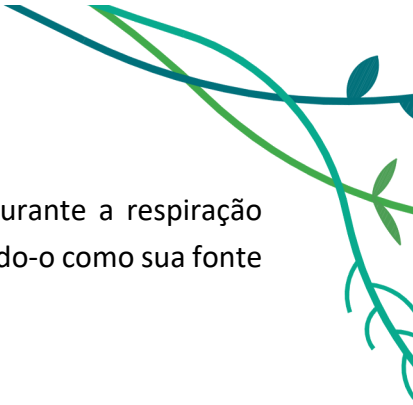


Figura 6. Visão esquemática do ciclo do carbono. A partir da fotossíntese, organismos fotossintetizantes retiram o gás carbônico da atmosfera e liberam oxigênio durante o processo. No processo fotossintético, moléculas orgânicas são geradas, que são transmitidas de um organismo a outro pela cadeia alimentar. O gás carbônico retorna ao ambiente a partir da respiração aeróbica. Processos como intemperismo, sedimentação e ação humana, também liberam o carbono ao ambiente. Adaptada de Mathewson (2003)¹³⁴.

As bactérias que participam na mobilidade do carbono também influenciam na mudança climática através da produção e consumo do gás metano, um dos gases intensificadores do efeito estufa^{77,78}. A produção do gás metano é realizada pelas arqueobactérias metanogênicas que,



tipicamente, formam metano usando CO₂ comoceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica, e pelas bactérias metanotróficas, que oxidam o metano, consumindo-o como sua fonte de carbono⁵².

Métodos de Análise das Comunidades Bacterianas do Solo

Como visto, as bactérias exercem diversas funções no ecossistema, como ciclar nutrientes, promover o crescimento vegetal, bem como realizar a biodegradação. Do mesmo modo, seu consumo e produção de gases, como dióxido de carbono, metano e óxidos de nitrogênio possibilita que tais micro-organismos tenham a capacidade de contribuir em grandes mudanças, como aquecimento global e depleção da camada de ozônio^{77,78}. Portanto, é de suma importância que se leve em consideração a biodiversidade do solo e o funcionamento biológico ao manejar os ecossistemas naturais ou projetar sistemas de cultivo e avaliar seus impactos⁷⁹.

O monitoramento das comunidades microbianas do solo representa um grande desafio para melhor valorizar os recursos do solo e implementar um manejo mais sustentável destes na agricultura e silvicultura^{79,80}. A complexidade de ambientes naturais e as condições de vida em constante mudança também representam um grande obstáculo, tanto para as bactérias que lá vivem, como para os microbiologistas que as identificam.

Os solos são estruturalmente mais complexos que a água e o ar, devido à sua granulometria específica, a presença de detritos orgânicos e de material mucoide e umidificado, o que explica a maior dificuldade de analisá-los⁸¹. Dentre tais dificuldades podemos citar, como exemplo, os ácidos húmicos e os minerais de argila, que podem inibir reações enzimáticas que fazem parte de ensaios de detecção molecular⁸². Além disso, o solo constitui uma rede complicada de poros cheios de gás ou água, onde as bactérias comumente aderem a superfícies de minerais e matéria orgânica. Essa estrutura porosa pode mascarar as células bacterianas, dificultando a microscopia direta e *in situ* do ambiente do solo^{81,82}.

A diversidade taxonômica e funcional extremamente elevada da microbiota do solo é o reflexo de um ambiente altamente complexo⁸³. Amostras de solo e solo-planta quando comparadas a amostras aquáticas são mais desafiadoras quanto ao desenvolvimento de métodos de detecção. A seguir, serão abordadas as técnicas mais comumente utilizadas para analisar a comunidade bacteriana dos solos. Destas, o isolamento bacteriano é dependente de cultivo. As demais (como o microarranjo e o sequenciamento de última geração) são independentes de cultivo e consideradas análises de alto rendimento.

Isolamento bacteriano

Nos estudos iniciais de ecologia e comunidades microbianas, as técnicas de enriquecimento seletivo, baseadas no uso de inibidores específicos e de fontes de nutrientes, foram os principais métodos para detectar grupos específicos de micro-organismos no solo e seu desenvolvimento⁸⁴. O número mais provável (NMP) de colônias de bactérias em placas com meios seletivos, também foi, durante muito tempo, o único método de contagem de bactérias viáveis em seus habitats naturais⁸⁵. O isolamento bacteriano permanece importante até hoje, pois as técnicas dependentes de cultura são seletivas e projetadas para detectar organismos com formas particulares de multiplicação ou capacidades bioquímicas. Além disso, somente através do isolamento e subsequente cultivo de bactérias representativas do solo é que podemos ter acesso ilimitado às células bacterianas, possibilitando, desta forma, a realização de estudos detalhados da sua biologia. Também é através do isolamento que são obtidas linhagens bacterianas que podem ser utilizadas como inoculantes ou controle biológico na agricultura.

Os métodos que dependem de cultivo, como o isolamento e a contagem de colônias em placas, são métodos relativamente rápidos, economicamente viáveis e podem fornecer informações importantes sobre as bactérias heterotróficas ativas da comunidade⁸⁶. No entanto, essas técnicas possuem desvantagens, como o potencial de inibição e contaminação entre colônias⁸⁷; os resultados variam de acordo com as condições de multiplicação (temperatura, pH e luz); e micro-organismos com rápidas taxas de multiplicação em placa são favorecidos. Além do mais, essas técnicas subestimam o número de bactérias e não fornecem quantitativamente a real diversidade desses micro-organismos^{3,88}, levando a muitas discussões a respeito de bactérias que não são cultiváveis na natureza^{89,90}.

Análises de Alto Rendimento

A análise da ecologia microbiana do solo não significa apenas a identificação da biomassa microbiana total e da diversidade da comunidade, mas, também, o estudo da multiplicação microbiana, da função, da distribuição e das interações entre as espécies. Deste modo, seria necessário que questões fundamentais fossem respondidas, como: (1) Quais são a estrutura e composição da comunidade microbiana? (2) Quais são as funções metabólicas/genes funcionais expressos para que os micro-organismos possam executar o ciclo biogeoquímico principal no ecossistema? (3) Como as atividades funcionais dos micro-organismos se relacionam com as principais funções do ecossistema, incluindo ciclos biogeoquímicos, fluxo de energia etc.⁹¹? Além disso, atividades antrópicas, incluindo o desenvolvimento de cidades e da agricultura, o uso de pesticidas e outras formas de poluição afetam diretamente a diversidade microbiana do solo^{92,93,94,95}.

A rápida evolução das técnicas com abordagens moleculares, como o microarranjo de DNA, sequenciamento de última geração de ácidos nucleicos, espectroscopia de massa e microscopia, permitiram que os campos da genômica, transcriptômica e proteômica começassem a ser aplicados mais prontamente aos estudos ecológicos do solo⁹⁶. Com uma frequência maior, as abordagens moleculares estão sendo usadas para abrir a chamada “caixa preta” da vida microbiana no solo, permitindo aos ecologistas detectar e caracterizar uma vasta diversidade de micróbios do solo anteriormente inimaginável (90-99% da comunidade biológica do solo). Porém, essas técnicas também apresentam algumas desvantagens, como os vieses que podem ser adicionados a praticamente todas as etapas – desde a amostragem do solo à análise da sequência, que devem ser levados em consideração ao interpretar os resultados de análises subsequentes (Figura 7)⁹⁷.

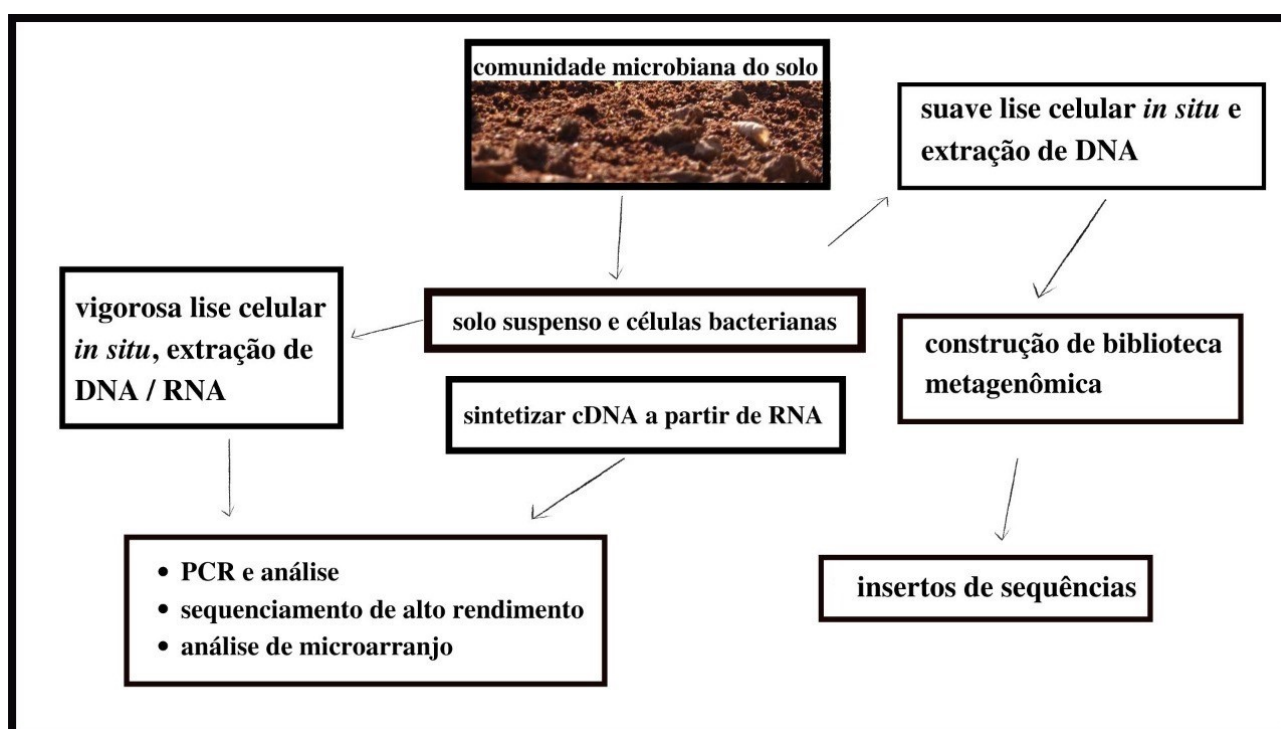
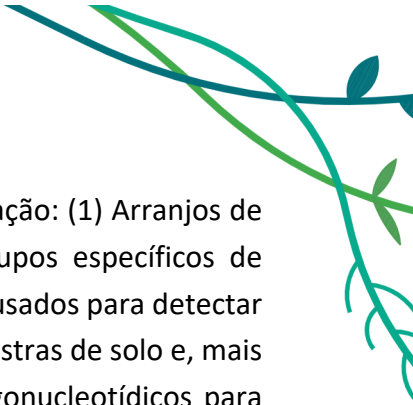


Figura 7. Fluxograma mostrando a sequência de procedimentos realizados para a análise de comunidades bacterianas do solo por técnicas moleculares. A comunidade microbiana do solo incluirá bactérias, arqueias, fungos, protistas e microfauna. Adaptado de Hirsch e colaboradores (2010)¹³⁵.

Microarranjo de DNA

Microarranjo é um arranjo bidimensional de fragmentos de DNA sobre um substrato sólido (geralmente uma lâmina de vidro ou célula de filme fino de silício) que analisa (testa) grandes quantidades de material biológico usando métodos de processamento e detecção miniaturizados, multiplexados e paralelos. Basicamente, três tipos de microarranjos são usados para o estudo da




ecologia dos solos, baseados nos tipos das sondas e no seu potencial de aplicação: (1) Arranjos de Comunidades Genômicas (CGA), usados para comparar os genomas de grupos específicos de organismos ou diversidade bacteriana; (2) Arranjos Gênicos Funcionais (FGA), usados para detectar a presença de genes de função conhecida em populações microbianas em amostras de solo e, mais recentemente, usado para detectar expressão gênica^{98,99}; e (3) Arranjos Oligonucleotídicos para Filogenias (POA, do inglês *Phylogenetic Oligonucleotide Array*), utilizados para caracterizar a diversidade relativa de organismos em determinada amostra, através da utilização de sondas baseadas na sequência de rRNA^{100,101}.

A ideia de microarranjo foi primeiramente introduzida por Tse Wen Chang, em 1983¹⁰². Nesse trabalho, foi investigado o potencial de determinação múltipla e simultânea de antígenos específicos da superfície celular em uma reação empregando pontos ordenados de anticorpos em uma superfície sólida. No entanto, a indústria do "*chip gene*" só começou a crescer significativamente após a publicação do trabalho de Schena e colaboradores¹⁰³, em 1995, que teve como objetivo estudar a expressão gênica diferencial em questões relacionadas à saúde. As aplicações dessa metodologia também foram extrapoladas para estudos ambientais, como expressão gênica diferencial em resposta a poluentes ambientais^{104,105}. Além da expressão gênica, o microarranjo tem sido utilizado para monitorar processos ambientais^{105,106,107,108,109,110,111,112,113} e, também, para o diagnóstico clínico^{114,115}.

Os microarranjos de DNA são tipicamente compostos por milhares de sequências de DNA, chamadas de sondas, fixadas a um substrato de vidro ou silício através de agulhas robotizadas ou sintetizadas *in situ* por tecnologias fotolitográficas ou de jato de tinta. As sondas contêm sequências complementares às das sequências-alvos e podem conter sequências de cDNA longas (500-1500 nucleotídeos) ou sequências de oligonucleotídeos mais curtas (25-70)¹¹⁶. O princípio do microarranjo consiste basicamente na hibridização entre uma mistura de moléculas-alvo marcadas com fluoróforo e uma mistura de sondas. Um exemplo típico da aplicação dessa técnica é a comparação entre duas amostras distintas (por exemplo, uma amostra de solo antes e depois da inoculação com uma PGPB); nesta condição, moléculas de DNA provenientes das duas amostras distintas são marcadas cada uma com um fluoróforo diferente (Cy3 e Cy5 ou Alexa 555 e Alexa 647) e, juntas, são hibridizadas às sondas de um mesmo *chip* de microarranjo. Já em experimentos com um único tipo de amostra é utilizado somente um tipo de fluoróforo para marcação e requerem hibridizações separadas das amostras controle e referência¹¹⁷.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Com o advento do método de Maxam-Gilbert, também conhecido como método de sequenciamento químico, e do método de terminação da cadeia de Sanger, em 1977, os cientistas ganharam a capacidade de sequenciar o DNA de maneira confiável⁹⁶. O método de Sanger




prevaleceu dos anos 80 até meados de 2000 devido à sua facilidade e confiabilidade comparativas e foi o método usado na tecnologia de primeira geração. Em 2006, começaram a surgir técnicas de sequenciamento de segunda e terceira geração, que permitiam examinar imparcialmente bilhões de modelos de DNA e RNA¹¹⁸.

O sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) abrange métodos de sequenciamento de alto rendimento que permitem que milhões a trilhões de observações sejam feitas em paralelo durante uma única execução, revolucionando as capacidades de sequenciamento e lançando a “nova geração” na ciência genômica. A primeira tecnologia NGS a ser comercializada em 2005 foi a técnica de pirosequenciamento da 454 Life Sciences (agora Roche)¹¹⁹. Depois disso, Solexa/Illumina (2007), sequenciamento por ligação e detecção de oligonucleotídeos (SOLiD) pela Applied Biosystems (2007) e Ion Torrent (2010) foram comercializadas¹²⁰.

Os avanços no NGS e sua inclusão rotineira nas pesquisas têm permitido descrições cada vez mais detalhadas de micro-organismos dos mais diversos ambientes do mundo, como cavernas, florestas, fontes termais, desertos, monumentos etc.^{121,122,123,124,125}, e um crescente interesse em como estes micro-organismos podem influenciar o sistema que habitam como um todo. Um número crescente de estudos tem mostrado que o microbioma é uma parte importante da dinâmica dos ecossistemas, sendo um parâmetro indispensável para avaliar a qualidade do ambiente em que habitam, como os solos e a água^{126,127}.

A diversidade das comunidades bacterianas e a interação destas com os parâmetros físico-químicos dos ambientes também têm sido utilizadas como indicadores de qualidade dos habitats¹²⁸. Um estudo baseado em NGS de comunidades bacterianas do solo mostrou que a conversão de floresta primária da Amazônia em pastagem aumenta a diversidade alfa [diversidade de cada sítio ou amostra, que se relaciona à riqueza de espécies (número de espécies distintas), e à distribuição taxonômica], mas diminui a diversidade beta (diferença de composição e espécies entre diferentes sítios ou amostras), resultando na homogeneização das comunidades no espaço. Essa homogeneização é impulsionada pela perda de bactérias do solo da floresta com faixas restritas (endêmicas) e resulta em uma perda substancial de diversidade¹²⁹. Kaschuk e colaboradores⁹⁴, em 2011, também utilizando NGS, investigaram a resposta de vários parâmetros microbianos e químicos do solo a alterações causadas por diferentes usos da terra (florestas nativas, pastos e sistemas de cultivo perenes e anuais) nos diferentes biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampa, Pantanal e Mata Atlântica). Neste trabalho, os autores observaram que a introdução de práticas agrícolas em todos os biomas, cobertos anteriormente com vegetação natural, afetou profundamente um dos mais promissores indicadores de solo, a biomassa microbiana-C (BM-C) - com uma diminuição geral.




Apesar de não fazer uso de procedimentos de sequenciamento de alto rendimento, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem animado produtores agrícolas e pesquisadores da área de engenharia genética. Ao serem comparados os genomas de várias bactérias, cientistas observaram um padrão curioso em certas regiões de DNA: trechos formados por sequências palindrômicas espaçadas entre si por sequências únicas - nomeadas de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Inter espaçadas ou CRISPR (do inglês para *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Essas sequências únicas eram idênticas ao DNA de vírus que atacam bactérias e que funcionam como uma "etiqueta" para identificar os vírus invasores. As enzimas Cas (proteínas associadas a CRISPR) reconhecem a "etiqueta" e usam essa informação para localizar e clivar o DNA dos vírus, impedindo sua ação nas bactérias. Por engenharia genética é possível direcionar o sistema CRISPR/Cas9 para clivar o DNA em uma localização específica. A tecnologia é revolucionária, porque permite "editar" a sequência do genoma com precisão não somente de vírus, mas também de plantas, fungos e animais, inclusive em embriões humanos. Essa possibilidade tem gerado discussões a respeito dos aspectos éticos de sua utilização, porém tal método não produziria transgênicos, pois não envolve transferência de genes entre espécies¹³⁰.


Considerações finais

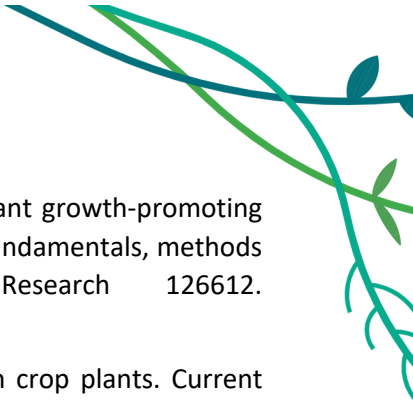
Com o avanço do conhecimento nas áreas da Microbiologia e Ecologia e das técnicas para avaliar a diversidade das comunidades bacterianas fica cada vez mais evidente a importância da microbiota na manutenção dos processos vitais à vida na Terra. Não só o solo é influenciado pelos micro-organismos que nele vivem, mas plantas e animais também estão diretamente relacionados com o tipo de microbiota que com eles interage. Conhecer e preservar a diversidade bacteriana em cada ambiente é fundamental para a continuidade dos diferentes ecossistemas e ações que busquem o uso do solo de forma sustentável podem garantir a produção de alimentos em grande quantidade, sem que os recursos naturais sejam esgotados.


Referências

- 1 - Madigan, M., Martinko, J., Bender, K. 2016. Microbiologia de Brock. 14th. ed. Artmed, Porto Alegre.
- 2 - Dykhuizen, D. 2005. Species numbers in bacteria. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 3 (56): 62–71.
- 3 - Torsvik, V., Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240–245.
- 4 - Mattos. A.M.L. 2015. Microbiologia do solo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.


- 
- 5 - Andreola, F., Fernandes, S.A.P. 2007. A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas In: Silveira, A.P.D., Freitas, S.S. (eds). Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental, p. 30-37. Instituto Agrônomo, Campinas, SP.
 - 6 - Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R. D., Van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11(3): 296–310.
 - 7 - Cotta, S.R. 2016. O solo como ambiente para a vida microbiana. In: Cardoso, E.J.B.N., Andreote, F. D. (eds). Microbiologia do Solo, p. 23-36. ESALQ, Piracicaba, SP..
 - 8 - Dabert, P., Delgen, J. 2002. Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Environmental Science & Bio/Technology* 1: 39-49.
 - 9 - Lambais, M.R., Cury, J.C., Maluche-Baretta, C.R., et al. 2005. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. *Tópicos em Ciência do Solo* 4: 43-84.
 - 10 - Coûteaux, M.M., Darbyshire, J F. Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology* 10 (3): 229-237. [https://doi.org/10.1016/s0929-1393\(98\)00122-x](https://doi.org/10.1016/s0929-1393(98)00122-x)
 - 11 - Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109–117.
 - 12 - Glick B.R., Patten C.L, Holguin G. et al. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
 - 13 - Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Tibtech* 7: 39-44.
 - 14 - Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32: 1559-1570.
 - 15 - Tyc, O., Song, C., Dickschat, J.S., Voz, M., Garbeva, P. 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology* 25 (4): 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
 - 16 - Dror, B., Jurkevitch, E., Cytryn, E. 2020. State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 107838. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107838>
 - 17 - Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169 (1): 30-39.
 - 18 - Lastochkina, O., Aliniaefard, S., Seifikalhor, M et al. 2019. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat. In: Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M.A. (eds). *Wheat production in changing environments*, p. 179-614. Springer Nature, Cham. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23
 - 19 - Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment* 32: 1682-1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028>
 - 20 - Smith, K.P., Goodman, R.M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology* 37: 473-491.

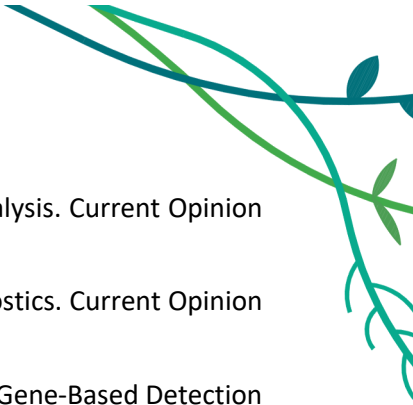
- 
- 21 - Miransari, M. 2011. Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92: 875-885.
- 22 - Glick, B.R. 2015. Beneficial plant-bacterial interactions. First ed. Springer International Publishing, Ottawa.
- 23 - Hayat, R., Ali, S., Amara, U. et al. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology* 60 (4): 579–598.
- 24 - Singh, V.K., Singh, A.K., Singh, P.P. et al. 2018. Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 267: 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.020>
- 25 - Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. American Society for Microbiology, Washington/D.C.
- 26 - Erismann, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J. et al. 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1 (10): 636-639.
- 27 - Numan, M., Bashir, S., Khan, Y. et al. 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, 209: 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- 28 - Souza, R. de, Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38 (4): 401–419.
- 29 - Goldstein, A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini, A., Yagil, E., Silver, S. (eds). *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*, pp. 197-203. ASM, Washington/D.C.
- 30 - Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 29-43.
- 31 - Eijk, D.V.D. 1997. Phosphate fixation and the response of maize to fertilizer phosphate in Kenyan soils. 186p. Master thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- 32 - Whitelaw, M.A., Harden, T J., Helyar, K.R. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 655-665.
- 33 - Reyes, I., Bernier, L., Simard, R.R. et al. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 281-290.
- 34 - Rodriguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- 35 - Silva Filho, G. N., Narloch, C., Scharf, R. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por micro-organismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 847-854.
- 36 - Ramakrishna, W., Rathore, P., Kumari, R. et al. 2019. Gold of Marginal Soil: Plant Growth Promoting Bacteria to Overcome Plant Abiotic Stress for Agriculture, Biofuels and Carbon Sequestration. *Science of the Total Environment* 135062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135062>

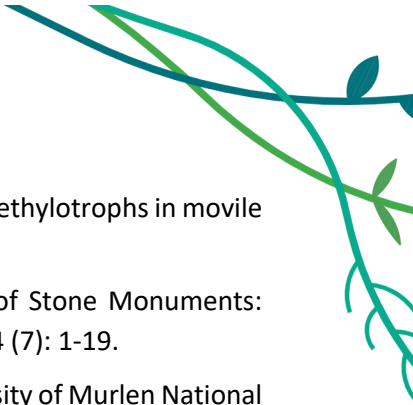
- 
- 37 - Morales-Cedeño, L.R., Orozco-Mosqueda, M.C., Loeza-Lara, P.D. et al. 2020. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research* 126612. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>
- 38 - Peleg, Z., Blumwald, E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 290-295.
- 39 - Iqbal, N., Umar, S., Khan, N.A. et al. 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany* 100: 34-42.
- 40 - Rodrigues, J.D., Godoy, L.J.G., Ono, E.O. 2004. Reguladores vegetais: Bases e princípios para utilização em gramados. II. Simpósio sobre gramados, Botucatu.
- 41 - Glick, B.R., Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens, *Biotechnology Advances* 15 (2): 353-378.
- 42 - Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R. 2004. Applications of free-living plant growth-promotor rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 1-25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- 43 - Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O. 2017: Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- 44 - Ruiu, L. 2020. Plant-Growth-Promoting Bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests. *Agronomy* 10: 861.
- 45 - Blumer, C., Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology* 173: 170–177. 2000. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- 46 - Haas, D., Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology* 3: 307-319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- 47 - Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A. et al. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169 (5-6): 325-336. 2014.
- 48 - Ramakrishna, W., Yadav, R., Li, K. 2019. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology* 138: 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>
- 49 - Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2 (1): 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- 50 - Khabbazi, S.E., Ladhakshmi, D., Babu, M. et al. 2019. Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)—A Versatile Tool for Plant Health Management. *Canadian Journal of Pesticides & Pest Management*, 1 (1): 1-25. <https://doi.org/10.34195/can.j.ppm.2019.05.001>
- 51 - Sansinenea, E. 2019. *Bacillus* spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Singh, H.B., Keswani, C., Reddy, M.S. et al. (eds). *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*, pp. 225-237. Springer Nature, Cham. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11

- 
- 52 - Prosser, J.I. 2006. Microorganisms Cycling Soil Nutrients and Their Diversity. In: Van Elsas, J.D., Jansson, J.K., Trevors, J.T. (eds.). Modern Soil Microbiology, p. 237-382. 2nd. ed. Taylor & Francis, Boca Raton.
- 53 - Madsen, E.L. 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. Current Opinion in Biotechnology 22 (3): 456-464. <https://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.008>
- 54 - Jickells, T.D. 1998. Nutrient Biogeochemistry of the Coastal Zone. Science 281 (5374): 217-222.
- 55 - Middledrop, P, Briglia, M, Salkinoja-Salonen, M. 1990. Biodegradation of pentachlorophenol in natural polluted soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. Microbial Ecology 20: 123-139.
- 56 - Burd, G, Dixon, D.G., Glick, B.R. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian Journal of Microbiology, 46: 237-245.
- 57 - Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., Musaratt, J. 2008. Significance of *Bacillus subtilis* strains SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. Chemosphere 64: 991-997.
- 58 - Bottomley, P.J., Maggard, S.P. 1990. Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Applied and Environmental Microbiology 56: 533-540.
- 59 - Bottomley, P.J., Dughri, M.H. 1989. Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. Applied and Environmental Microbiology 55: 959-964.
- 60 - Lynch, J.M. 1983. Soil biotechnology. Blackwell, Oxford.
- 61 - Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. Annual Review of Phytopathology 12: 181-197.
- 62 - Bruijn, F.J.d. 2015. Biological Nitrogen Fixation, Volume II. 1st. ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- 63 - Brady, N.C. 1984. The nature and properties of soils. 9th ed. Macmillan Publishing Company, New York.
- 64 - Ledger, T., Poupin, M.J., Timmermann, T. et al. 2019. PGPR compositions and methods for improved cultivation of tomato and potato species, US Patent 10513681.
- 65 - Weil, R.R., Brady, N.C. 2017. The Nature and Properties of Soils. 15th ed. Pearson Education, Harlow.
- 66 - Haynes, R.J., Mokolobate, M.S. 2011. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. Nutrient Cycling in Agroecosystems 59: 47-63.
- 67 - Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. et al. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2 (1): 1-14.
- 68 - Ohtake, H., Wu, H., Imazu, K. et al. 1996. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. Resources, Conservation & Recycling 18: 125-134.
- 69 - Sperberg, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9: 778-781.
- 70 - Katznelson, H., Peterson, E.A., Rovatt, J.W. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. Canadian Journal of Botany 40: 1181-1186.
- 71 - Raghu, K., Macrae, I.C. 1966. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. Journal of Applied Bacteriology 29 (3): 582-586.

- 72 - Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Wiley and Sons, New York.
- 73 - Dick, W.A., Kost, D., Chen, L. 2008. Availability of Sulfur to Crops from Soil and Other Sources. In: Jez, J. (ed.). Sulfur; A Missing Link between Soils, Crops, and Nutrients, p. 59-82. 1st. ed. ASA, CSSA, SSSA, Madison.
- 74 - McClung, A.C., Freitas, L.M.M. 1959. Sulfur deficiency in soils from Brazilian campus. Ecology 40 (2): 315-317.
- 75 - Ribeiro, E.S., Dias, L.E., Alvarez, V.H. et al. 2001. Dynamics of Sulfur Fractions in Brazilian Soils Submitted to Consecutive Harvests of Sorghum. Soil Science Society of America Journal 65: 787-794.
- 76 - Mishra, A., Sharma, S.D., Khan, G.H. 2003. Improvement in physical and chemical properties of sodic soil by 3-, 6- and 9-years old plantation of *Eucalyptus tereticornis* bio rejuvenation of sodic soil. Forest Ecology and Management 184 (1-3): 115-124.
- 77 - Bardgett, R.D., Freeman, C., Ostle, N.J. 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. ISME Journal 2 (8): 805-814.
- 78 - Dean, J.F., Middelburg, J.J., Röckmann, T. et al. 2018. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world. Reviews of Geophysics 56 (1): 207-250.
- 79 - Lemanceau, P., Maron, P-A., Mazuriei, S. et al. 2014. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. Agronomy for Sustainable Development 35: 67-81.
- 80 - Bender, S. F., Wagg, C., van der Heijden, M.G.A. 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. Trends in Ecology & Evolution 31: 440-452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>
- 81 - Paul, E.A. 2015. Microbiology, Ecology, and Biochemistry. 4th. ed. Elsevier, Fort Collins. https://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2389.2008.01052_2.x
- 82 - Allison, S.D. 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: Implications for ecosystem processes. Biogeochemistry 81 (3): 361-373.
- 83 - Standing, D., Killham, K. 2006. The Soil Environment. In: van Elsas, J.D., Jasson, J.K., Trevors, J.K. (eds.). Modern Soil Microbiology, pp. 1-22. 2nd. ed. Taylor & Francis, London, New York.
- 84 - Nybroe, O., Brandt, K.K., Nicolaisen, J.H. et al. 2006. Methods to Detect and Quantify Bacteria in Soil. In: van Elsas, J.D., Jasson, J.K., Trevors, J.K. (eds.). Modern Soil Microbiology, p. 284-316. 2nd. ed. Taylor & Francis, London, New York.
- 85 - Kandeler, E. 2015. Physiological and Biochemical Methods for Studying Soil Biota and Their Functions. In: Paul, E.A. (ed). Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry, p. 152-222. 4th. ed. Academic Press, London.
- 86 - Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L. et al. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. Applied Soil Ecology 15: 25-36.
- 87 - Trevors, J.T. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. Water, Air and Soil Pollution 101: 45-67.
- 88 - Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M. et al. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods 58 (2): 169-188.

- 
- 89 - Oliver, J.D. 1993. Formation of Viable but Nonculturable Cells. In: Starvation Bacteria (Kjelleberg, S., ed). 1st. ed. Springer, New York, p. 239–272.
- 90 - Stewart, E.J. 2012. Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology* 194 (16): 4151–4160.
- 91 - Paul, D., Kumar, S., Mishra, M. et al. 2018. Molecular Genomic Techniques for Identification of Soil Microbial Community Structure and Dynamics. In: Adhya, T.K., Lal, B., Mohapatra, B. et al. (eds.). *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Volume 1: Soil-Microbe Interaction*, p. 9-33. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore.
- 92 - Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y. et al. 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* 37 (1-2): 18–30.
- 93 - Jesus, E.C., Marsh, T., Tiedje, J.M. et al. 2009. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal* 3 (9): 1004–1011.
- 94 - Kaschul, G., Alberton, O., Hungria, M. 2011. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: Inferences to improve soil quality. *Plant and Soil* 338 (1): 467-481.
- 95 - Lan, G., Li, W., Wu, Z. et al. 2017. Soil bacterial diversity impacted by conversion of secondary forest to rubber or eucalyptus plantations: A case study of Hainan Island, South China. *Forest Science* 63 (1): 87-93.
- 96 - Kulski, J. K. 2015. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In: Kulski, J. K. (ed.). *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, p. 3-60. IntechOpen, London.
- 97 - Lombard, N., Prestat, E., van Elsas, D. J. et al. 2011. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 31-49.
- 98 - He, Z., Gentry, T.J., Schadt, C.W. et al. 2007. GeoChip: A comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological, and environmental processes. *ISME Journal* 1 (1): 67-77.
- 99 - Vibhuti, M., Kumar, A., Sheoran, N. et al. 2017. Molecular basis of endophytic *Bacillus megaterium*-induced growth promotion in *Arabidopsis thaliana*: Revelation by microarray-based gene expression analysis. *Journal of Plant Growth Regulation* 36 (1): 118-130.
- 100 - Thies, J. E. 2015. Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. In: Paul, E. A. (ed.). *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, p. 151-185. 4th. ed. Elsevier, Fort Collins.
- 101 - Zhou, J.K.D. 2002. Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 204–207.
- 102 - Chang, T.W. 1983. Binding of Cells to Matrixes of Distinct Antibodies Coated on Solid Surface. *Journal of Immunological Methods* 65: 217-223.
- 103 - Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. et al. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235): 467-470.
- 104 - Letowski, J., Brousseau, R., Masson, L. 2011. DNA Microarray Applications in Environmental Microbiology. *Analytical Letters* 36 (15): 37-41.

- 
- 105 - Zhou, J. 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Microbiology* 6: 288-294.
- 106 - Bodrossy, L., Sessitsch, A. 2004. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Current Opinion in Microbiology* 7: 245-254.
- 107 - Loy, A., Lehner, A., Lee, N. et al. 2002. Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 5064-5081.
- 108 - Rhee, S., Liu, X., Wu, L. et al. 2004. Detection of Genes Involved in Biodegradation and Biotransformation in Microbial Communities by Using 50-Mer Oligonucleotide Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 4303-4317.
- 109 - Steward, G.F., Jenkins, B.D., Ward, B.B. 2004. et al. Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1455–1465.
- 110 - Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A. et al. 2003. Oligonucleotide Microarray for the Study of Functional Gene Diversity in the Nitrogen Cycle in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 1159-1171.
- 111 - Tiquia, S. M., Wu, L., Chong, S.C. et al. 2004. Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *BioTechniques* 36 (4): 664-675.
- 112 - Wu, L., Liu, X., Schadt, C. W. et al. 2006. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 4931-4941.
- 113 - Zhou, J., Thompson, D. K., Xu, Y. et al. 2004. *Microbial Functional Genomics*. 1st. ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- 114 - Graham, R.P., Yeh, M.M., Lam-Himlin, D. 2017. et al. Molecular testing for the clinical diagnosis of fibrolamellar carcinoma. *Modern Pathology* 31 (1) 141–149. <https://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.103>
- 115 - Parolin, C., Giordani, B., Palomino, R.A.N. et al. 2017. Design and validation of a DNA-microarray for phylogenetic analysis of bacterial communities in different oral samples and dental implants. *Scientific Reports* 7 (1): 1-12.
- 116 - Russell, S., Meadows, L.A., Russell, R.R. 2009. *Microarray Technology in Practice*. 1st. ed. Elsevier, San Diego.
- 117 - Bumgarner, R. Overview of DNA microarrays: Types, applications, and their future. *Current Protocols in Molecular Biology* 101: 22.1.1-22.1.11.
- 118 - Levy, S.E., Myers, R.M. Advancements in next-generation sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 17 (1): 95-115.
- 119 - Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E. et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437 (7057): 376-380.
- 120 - Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P. et al. 2008. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* 456 (7218): 53-59.

- 
- 121 - Kumaresan, D., Stephenson, J, Doxey, A. C. et al. 2018. Aerobic proteobacterial methylotrophs in movele cave: genomic and metagenomic analyses. *Microbiome* 6 (1): 1-10.
- 122 - Li, Q., Zhang, B., Yang, X. et al. 2018: Deterioration-Associated Microbiome of Stone Monuments: Structure, Variation, and Assembly. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (7): 1-19.
- 123 - Mandal, S. de, Lalremsanga, H.T., Senthil, N. 2015. Genomics Data Bacterial diversity of Murlen National Park located in Indo-Burman Biodiversity hotspot region: A metagenomic approach. *Genomics Data* 5: 25-26. <https://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.025>
- 124 - Patel, R., Mevada, V., Prajapati, D. et al. 2015. Genomics Data Metagenomic sequence of saline desert microbiota from wild ass sanctuary, Little Rann of Kutch, Gujarat, India. *Genomics Data* 3: 137-139, 2015. <https://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2015.01.003>
- 125 - Yasir, M. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (2): 248-257. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.005>
- 126 - Glasl, B., Webster, N.S., Bourne, D. G. 2017. Microbial indicators as a diagnostic tool for assessing water quality and climate stress in coral reef ecosystems. *Marine Biology* 164 (4): 1-18.
- 127 - Vargas, R.S., Bataioli, R., Costa, P.B. et al. 2015. Microbial quality of soil from the Pampa biome in response to different grazing pressures. *Genetics and Molecular Biology* 38 (2): 205-212.
- 128 - Wang, R., Zhang, H., Sun, L. et al. 2017. Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Scientific Reports* 7 (1): 1-10. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00472-6>
- 129 - Rodrigues, J.L.M., Pellizari, V.H., Mueller, R. et al. 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (3): 988-993.
- 130 - Yanagui, K. 2016. Novas tecnologias, novos desafios. *Ciência e Cultura* 68: 8-11.
- 131 - Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63 (1): 541-556. <https://doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- 132 - Dall'Agnol, L.T., Moura J.J.G. 2014. Sulphate-reducing bacteria (SRB) and biocorrosion. In: Liegen et al. (eds.): *Understanding Biocorrosion. Fundamentals and Applications*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781782421252.1.77>
- 133 - Richardson, A.E., Barea, J.M.; McNeill, A.M. et al. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- 134 - Mathewson, J.H. 2003. Oceanography - Chemical. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00509-3>
- 135 - Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Clark, I.M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42 (6): 878-887. <https://doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.019>